

На правах рукописи

Брунчуков Виталий Андреевич

Экспериментальное применение клеточных технологий
при радиационных ожогах

Специальность
1.5.1. Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель

Астрелина Татьяна Алексеевна доктор медицинских наук, профессор, руководитель центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства

Официальные оппоненты:

Гривцова Людмила Юрьевна доктор биологических наук, заведующая отделением клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, г. Обнинск

Темнов Андрей Александрович доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории проблем клеточного стресса Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пущино

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, г. Челябинск.

Защита диссертации состоится «30» мая 2024 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 68.1.003.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» по адресу: 123098, г. Москва, ул. Живописная, 46. Тел.: +7 (495) 190-96-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и на сайте организации: <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/dissertation-council>

Автореферат разослан «04» апреля 2024 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Шандала Наталия Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заживление язвенной поверхности кожи с сохранением ее анатомической целостности и функциональной активности при радиационных ожогах (местном лучевом поражении - МЛП) остается серьезной проблемой в науке и клинике (Huang Y.Z., 2020). Несмотря на достижения в понимании механизма патогенеза МЛП, не всегда удается достигнуть полноценного излечения при использовании стандартных методов лечения.

МЛП характеризуются частым рецидивирующим ходом течения заболевания, что снижает качество жизни пациента (Manna B., 2022), требуют постоянного ухода за очагом поражения и негативно сказываются на трудоспособности пациента (Ryan J.L., 2012).

Повреждения базальных стромальных клеток эпидермиса и сосудов микроциркуляторного русла обуславливают степень повреждения кожи при МЛП. Исход течения заболевания будет зависеть от соотношения повреждений и репаративных процессов в данных структурах (Осанов Д.П., 1983). Регенеративная медицина является перспективным направлением современной медицины, способным улучшить качество жизни пациента, увеличить продолжительность его жизни, восстановить поврежденные функции и структуры его органов и тканей. В регенеративной медицине существует несколько направлений, способствующих восстановлению органов и дефектов тканей: стимуляция регенерации тканей различными веществами, использование органов и тканей для трансплантации, трансплантация клеток (Бадертдинов Р., 2012).

В качестве терапевтического источника для МЛП возможно применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) (Bensidhoum M., 2005; Moroz B.B., 2009; Portas M., 2016; Huang Y.Z., 2020). МСК способны самообновляться и могут дифференцироваться в различные виды тканей (Dominici M., 2006). Доказана эффективность МСК в заживлении раневой поверхности кожи и ее придатков (Qi Y., 2014), сердца (Haneef K., 2018), скелетных мышц и хряща (Lin H., 2019; Richardson S.M., 2016) и др. Применение МСК приводит к усилению процессов ангиогенеза, эпителизации, уменьшению процессов фиброобразования, улучшению грануляций, сокращению сроков заживления ран, восстановлению волосяного покрова. При этом основной терапевтический эффект МСК связан с действием их паракринного профиля, регулирующего межклеточные взаимодействия (Chen Z.Y., 2016; Temnov A.A., 2018; Zuo R., 2019; Rong X., 2019; Sun J., 2019; Huang Y.Z., 2020).

Однако на сегодняшний день данные по применению МСК из различных источников и их паракринных факторов для терапии МЛП противоречивы, что делает настоящее исследование актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Степень разработанности темы исследования вследствие отсутствия единого научно обоснованного подхода к эффективному лечению МЛП с применением клеточной терапии для заживления и сохранения анатомической целостности и функциональной активности кожных покровов, что является серьезной проблемой в науке и клинике. МЛП характеризуются длительным периодом заживления, сохраняя непрерывный воспалительный процесс, что приводит к деградации факторов, участвующих в заживлении

раны. Например, активно изучается эффективность комбинированного подхода лечения МЛП в сочетании с применением клеточной терапии, включающей использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их клеточных продуктов, минимально-манипулированных клеточных продуктов и др (Huang Y.Z., 2020; Yamanaka S., 2020; Su X, 2020 и др.).

Одним из важных вопросов вследствие отсутствия данных применения МСК слизистой десны человека, плаценты и их паракринных факторов для терапии МЛП делает важным внедрение понимания механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях и применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для лечения местных лучевых поражений.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение эффективности применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов в составе концентратов кондиционированных сред при местных лучевых поражениях кожи у лабораторных животных.

Задачи исследования

1. Изучить влияние МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных.
2. Исследовать морфологические и иммуногистохимические особенности регенерации кожного покрова при МЛП у лабораторных животных после применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред
3. Изучить влияние МСК слизистой десны крысы и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред, на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных
4. Исследовать морфологические и иммуногистохимические особенности регенерации кожного покрова при МЛП у лабораторных животных после применения МСК слизистой десны крысы и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред.
5. Сравнить эффективность применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека, слизистой десны крысы и их паракринных факторов в терапии кожного покрова при МЛП у лабораторных животных.

Научная новизна

1. Впервые показано, что применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека с 14 по 112 сутки после облучения приводит к сокращению язвенной поверхности местных лучевых поражений у лабораторных животных к концу эксперимента на 87%, 85,7% и 95,4% соответственно.
2. Применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения приводит к улучшению васкуляризации (увеличение экспрессии VEGF) и увеличению числа нервных волокон (увеличение PGP 9.5).
3. Впервые показано, что применение МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы с 14 суток по 112 сутки после облучения не приводит к существенному сокращению местных лучевых поражений и

способствует увеличению макрофагальной инфильтрации у лабораторных животных (увеличение маркера CD 68).

4. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека, а также концентрата культуральной среды показало наибольшую эффективность - полное заживление язвенно поверхности на 112 сутки после облучения в 60% и 40 % случаев, соответственно. Применение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, МСК плаценты человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой крысы приводит к полному заживлению в 20% случаев; применение МСК слизистой десны крысы и отсутствие терапии (в группе контроль) не приводит к полному заживлению.

5. Впервые показано, что применение МСК слизистая десны человека, слизистая десны крысы, плацента человека при местных лучевых поражениях с 21 по 112 сутки после облучения приводит к усилению процессов неоангиогенеза (увеличение экспрессии CD31). Применение МСК слизистой десны человека и МСК слизистой десны крысы приводит к усилению процессов ангиогенеза (увеличение VEGF в эндотелии и строме).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты исследований применения МСК слизистой десны и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны в зависимости от донора биоматериала (человек и крыса) противоположно различаются, которые можно использовать для дальнейшего изучения влияния и оценки методов лечения на процессы регенерации и заживления местных лучевых поражений. Результаты проведенных исследований демонстрируют сокращение язвенной поверхности (от 85 до 95%) МЛП у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения при применении МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека. Полученные результаты имеют важное теоретическое значение для радиобиологии, комбустологии, хирургии, регенеративной медицины и клеточной терапии, так как вносят существенный вклад в понимание механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях.

Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать для применения МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для эффективного лечения местных лучевых поражений.

Методология и методы исследования

На протяжении всего исследования проводились методы выделения и культивирования МСК из различных источников; методы концентрирования паракринных факторов из кондиционированных сред от МСК из различных источников; моделирование МЛП у лабораторных животных на рентгеновской установке; планиметрические, иммунологические и иммуногистохимические методы для оценки регенерации кожных покровов после облучения; оценка МСК из различных источников с помощью проточной цитофлуориметрии; наблюдение за лабораторными животными.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), Statistica 6 (StatSoft), ImageTool (UTHSCSF). Значимость статистических различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна».

Положения, выносимые на защиту

1. Применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой ткани человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека являются эффективными методами лечения местных лучевых поражений, приводящие к сокращению язвенной поверхности и обеспечивающие наибольшую эффективность полного заживления местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения.
2. Применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения обеспечивает улучшение васкуляризации увеличение экспрессии VEGF, и увеличению числа нервных волокон (увеличение экспрессии PGP 9.5).
3. Отсутствие эффективности (волнообразное сокращение и отсутствие заживления) применения МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой ткани десны крысы при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения сопровождается с увеличением воспалительного процесса за счет увеличения маркера клеток макрофагального ряда CD68 в тканях.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты диссертационной работы Брунчукова В.А. «Экспериментальное применение клеточных технологий при радиационных ожогах» соответствуют паспорту специальности 1.5.1 – Радиобиология, в частности к пунктам 1. «Взаимодействие различных видов ионизирующих излучений с веществом. Прямое и косвенное действие ионизирующих излучений на биологические объекты. Медикобиологические последствия действия радиации и разработка методов их минимизации. Стохастические и не стохастические эффекты; зависимости: дозаэффект и время-эффект»; п. 3 «Физико-химические и молекулярные механизмы первичных и начальных процессов лучевых нарушений, протекающих с момента возникновения ионизированных и возбужденных атомов и молекул до появления структурных и функциональных изменений в организме. Физические и биологические основы действия ионизирующего излучения. Острое и хроническое действие радиации», п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны; молекулярные механизмы репарации лучевых повреждений; механизмы радиационного горемезиса».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач, достаточным объемом исследования, применением современных лабораторных методов исследования, корректной статистической обработкой данных и всесторонней оценкой полученных результатов в сравнении с данными научной литературы.

Апробация диссертации проведена на заседании секции №2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Материалы диссертации были доложены на конференции International society for computed tomography 2018, Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», Межрегиональной молодежной научной конференции «Достижения и перспективы молодых ученых» 2019, Sechenov international biomedical summit 2019, Школе-конференции молодых учёных «Ильинские чтения» 2019, 2020, 2021, 2022, 2023; 15-th International Congress of the International Radiation Protection Association, Научно-практической конференции с международным участием «Научный авангард» 2021 и 2022; Международной научно-практической конференции «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей», 3-й

Российской конференции с международным участием «Радиобиологические основы лучевой терапии», Национальном конгрессе по регенеративной медицине 2019 и 2022.

Публикации

По материалам работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 5 статей – в изданиях, включенных в международные базы цитирования, и 1 патент.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, иллюстрирована 28 рисунками и состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, выводов, списка литературы, включающего 235 литературных источников: 21 – отечественных и 214 – иностранный автор.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Описание использованных лабораторных животных

В исследовании было использовано 160 лабораторных животных (самцы Wistar в возрасте 8-12 недель и массой $210,0 \pm 30,0$ грамм) из специализированного питомника лабораторных животных «Пушино», имели соответствующее ветеринарное свидетельство и прошли карантин в течение 14 дней. Исследование одобрено на секции Ученого совета (выписка № 43А от 25.09.2017 г.) и на заседании локального биоэтического комитета (Протокол № 86 от 10.11.2017) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России.

Лабораторные животные разделены на 8 групп (по 20 животных в каждой) в зависимости от вида проводимой терапии:

- 1-ая группа – К – контроль, в которой животные не получали терапию;
- 2-ая группа – КС – контроль с интрадермальным введением концентрата культуральной питательной среды трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения;
- 3-ья группа – Д – интрадермальное введение МСК слизистой десны человека трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;
- 4-ая группа – ДКС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;
- 5-ая группа – ДК – интрадермальное введение МСК слизистой десны крысы трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;
- 6-ая группа – ДККС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;
- 7-ая группа – П – интрадермальное введение МСК плаценты человека (Пл) трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения;
- 8-ая группа – ПКС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения.

После моделирования МЛП проводился мониторинг состояния лабораторного животного (осмотр кожной поверхности и оценка течение язвенного процесса (глубина повреждения, общая площадь измененной кожи, площадь язвенной поверхности, наличие отделяемого, пузырей, струпа, слущенного эпидермиса, цвете обнажённой дермы, фибринового налета). Вывод животных из эксперимента осуществляли на 28, 42, 56, 70, 91 и 112 сутки.

Выделение культуры МСК из слизистой ткани десны человека

Культуру МСК выделяли из неперсонифицированного образца биоптата слизистой ткани десны человека объемом 8 мм³. Полученный биоптат инкубировали в среде DMEM F12, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 4°C не менее 8 часов. Образец диспергировали и инкубировали в 0,25% растворе трипсин-EDTA (Gibco, США) при 37°C в течение 1 часа, после добавляли FBS (Gibco, США) и отмывали 1xPBS (300g, 7 минут). Образец инкубировали в 0,15% растворе коллагеназы II типа (Sigma, США) при 37°C в течение 2 часов. Культивировали во флаконах 25 см² (TPP, Швеция) в культуральной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human, пенициллин – стрептомицином (50 Ед/мл, ПанЭко, Россия) и L – глутамином (2мМ, ПанЭко, Россия) в течение 14 дней в инкубаторе 5% CO₂ при температуре 37°C.

Выделение и культивирование МСК слизистой десны крысы

Получали биоптаты слизистой десны крысы породы Wistar промывали, затем гомогенизировали, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. в 1мл 0.25% раствора трипсина-EDTA (Gibco, США), реакцию останавливали FBS (Gibco, США) и центрифугировали при 300g в течение 7 минут. Инкубировали в течение 2 ч при 37°C в 1 мл 0,15% раствора коллагеназы II типа (Sigma, США) и останавливали реакцию 1 мл FBS. Культивировали в питательной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (STEMCELL Technologies, Канада) во флаконах 25 см² до 3-6 пассажа в инкубаторе 5% CO₂ при температуре 37°C. Кондиционированную среду МСК собирали и замораживали при -20°C.

Культивирование МСК плаценты и слизистой десны человека

Использовали неперсонифицированные образцы МСК слизистой десны и плаценты человека, находящиеся на длительном криохраниении в криобанке Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Образцы размораживали при 37°C в водяной бане, культивировали во флаконах на 75 см² с 3-го по 6-й пассаж в среде без ксеногенных компонентов - xeno-free (Stem Cell, Канада) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина 100 Ед/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия); 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия). При достижении клетками 70-80% конфлюентности проводили пассирование образцов. Кондиционированную среду МСК собирали и замораживали при -20°C.

Оценка иммунологических характеристик и жизнеспособности МСК

Иммунофенотип и жизнеспособность МСК слизистой десны и плаценты человека определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр FACS Canto II Becton Dickinson CA, США). Экспрессию поверхностных маркеров МСК слизистой десны человека и плаценты оценивали с помощью меченных флуорохромами антител против CD34-, CD45-, CD90+, CD105+, CD73+, HLA-DR в соответствии с инструкцией производителя. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя 7-AAD, проникающего через цитоплазматическую мембрану клетки и связывающегося с ее ДНК. Определяли количество позитивных CD45+ негативных 7-AAD- клеток в соответствии с инструкцией производителя.

Получение концентрата культуральной и кондиционированных сред

Получение концентрата культуральной и кондиционированных сред проводили с помощью лабораторной системы фильтрации в тангенциальном потоке LabScale (MerkMillipore, Germany) путем концентрирования, диафильтрации и микрофильтрации. Культуральную или кондиционированную среду помещали в цилиндр для фильтрации в тангенциальном потоке и осуществляли ее концентрирование (Таблица 1).

Таблица 1 - Параметры лабораторной системы фильтрации для получения концентратов кондиционированной среды.

Группа	Исходный объем, мл	Конечный объем, мл	Входное давление монометра, psi	Давление монометра ретентата, psi	Концентрация, раз	Концентрация белка, мкг/мл
КС	250	26	34-45	10-15	9,6	924
ДКС	250	27	35-50	10-20	9,3	944
ДККС	270	27	40-52	8-12	10	-
ПКС	242,5	30	40-50	6-12	8,1	648

Примечание: КС – концентрат культуральной среды MesenCult, ДКС – концентрат кондиционированной среды от МСК слизистой десны, ДККС – концентрат кондиционированной среды от МСК слизистой десны крысы, ПКС – концентрат кондиционированной среды от МСК плаценты человека.

Полученные объемы пропускали через нейлоновый шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм (Corning, США) и замораживали в пробирках 15 мл на -20°C для дальнейших манипуляций.

Облучение животных

Моделирование МЛП относительно «мягким» рентгеновским излучением проводили на рентгеновской установке ЛНК-268 (РАП100-10) (ООО «Диагностика-М», Россия). Животным в состоянии наркоза выбривали шерсть в пояснично-подвздошной области спины, фиксировали их к пенопластовой подложке. С помощью заранее подготовленного шаблона и черного маркера определяли центр и границы будущего поражения, затем производили облучение с режимом радиационного воздействия в дозе 110 Гр с алюминиевым фильтром 0,1 мм, напряжением 30 кВ, током пучка 6,1 мА, мощностью дозы 21,4 Гр/мин с точностью дозы $\pm 5\%$, неопределенность измерения дозы $\pm 6\%$ по предложенной ранее методике (Котенко К.В., 2013), приводящей к короткому латентному периоду и хронической язве кожи у лабораторных животных. После облучения животных рассаживали по индивидуальным стерильным боксам с автономной системой вентиляции Smart Flow (Tecniplast Group, Италия), обеспечивая свободный доступ к воде и еде.

Введение МСК, кондиционированных сред и культуральной среды животным

Перед введением в зону поражения МСК, кондиционированными средами или культуральной средой животных вводили в наркоз. На 1 сутки обкалывание проводили по периметру вокруг моделируемой зоны поражения в 10-14 точках, отступая от ее границ 2-5 мм; на 14 и 21 сутки обкалывание проводили вокруг уже видимой области поражения так же с отступом от границ в 2-5 мм вводили МСК в дозе 2 млн клеток на 1 кг, концентрат кондиционированной среды с учетом концентрации клеток (2 млн клеток на 1 кг), концентрат культуральной среды 0,4 мл на животное.

Оценка повреждения кожи и ее придатков

Развитие лучевого поражения и эффективности применения клеточной терапии оценивали по динамике изменений клинической картины. Площадь пораженного участка (размер площади общей измененной кожи и размер площади язвенной поверхности) определяли с помощью с помощью планиметрического метода исследования и фотографической съемки. Расчет измерений производили с помощью программного обеспечения ImageTool (UTHSCSA).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

На 28, 42, 56, 70, 91 и 112 сутки у лабораторных животных иссекали биоптат лоскута кожи (область язвенного дефекта с прилежащей кожей и подлежащими мышцами) и

фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (Histoline, Россия). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином по стандартным гистологическим методикам. Иммуногистохимическое исследование образцов проводили автоматизированным методом с помощью иммуногистостейнера Ventana BenchMark Ultra с депарафинизацией и демаскировкой в аппарате с использованием антител (Novocastra, Великобритания). Количественно определяли антитела к CD31 (маркер эндотелиальных клеток), к CD68 (маркер макрофагов), к PGP 9.5 (маркер дифференцирующихся нейронов в коже), к Ki67 (маркер пролиферации клеток) и FVIII (фактор адгезии тромбоцитов). Экспрессию маркеров к Collagen I и III (коллаген I и III типа), VEGF (маркер эндотелия кровеносных сосудов кожи) оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия. Иммуногистохимические маркеры оценивали в абсолютном количестве в 10 полях зрения на препарат при увеличении $\times 200$ (FVIII в сосудах, PGP 9.5, CD31) и $\times 400$ (FVIII в строме, CD68, Ki67).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), Statistica 6 (StatSoft), ImageTool (UTHSCSF). Значимость статистических различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение. Статистически достоверным считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияние МСК и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред на регенерацию кожного покрова при МЛП у животных

При визуальном осмотре кожных покровов животных в зоне моделирования МЛП на 3-и сутки наблюдали появление первичной эритемы, сопровождающейся нарушением нормального тонуса кожи. К 7-м суткам у животных наблюдали признаки появления демаркационной линии, при этом у некоторых животных отмечали раннее развитие сухого дерматита в области облучения. К 14 суткам у всех животных зарегистрировано появление влажного дерматита, сопровождающееся увеличением размеров области пораженной кожи с формированием язвенной поверхности. Далее происходило заживление язвенной поверхности за счет краевой эпителизации с возникновением рецидивирующих процессов у отдельных животных, что сопровождалось увеличением площади язвенной поверхности (Рисунок 1, Таблица 2).

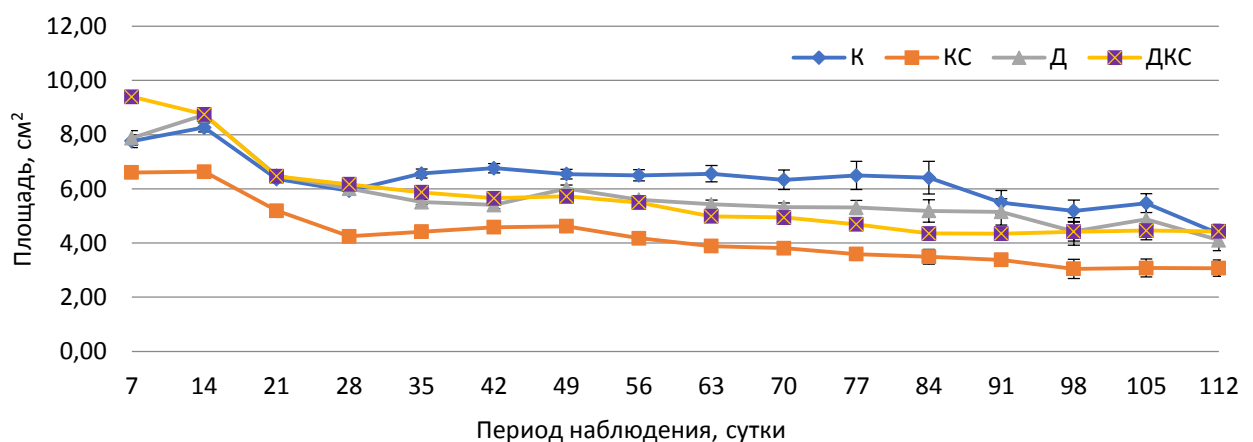


Рисунок 1 - Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д, ДКС.

Таблица 2 - Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д и ДКС, см².

Сутки	К	КС	Д	ДКС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	7,87±0,54	9,40±0,39#&
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,72±0,35#	8,75±0,34#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,48±0,18#	6,46±0,24#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	6,01±0,20#	6,17±0,28#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,51±0,19*#	5,87±0,27*#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	5,40±0,28*#	5,65±0,30*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	6,01±0,25#	5,73±0,41*#
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	5,60±0,24#	5,50±0,38*#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	5,43±0,32#	4,49±0,26*#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	5,32±0,32#	4,94±0,19#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	5,31±0,53#	4,69±0,15*#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,19±0,83#	4,35±0,17*#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,15±0,96#	4,35±0,33#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	4,43±1,01	4,42±0,69
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	4,87±1,13	4,46±0,68
112	4,35±0,42	3,07±0,60	4,10±0,78	4,43±0,53

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Д и ДКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & - достоверные различия между группой ДКС и Д ($p \leq 0,05$)

В период с 7 по 28 сутки эксперимента при оценке площади общей измененной кожи во всех группах эксперимента сохранялась тенденция ее уменьшения. С 28 по 49 сутки эксперимента отмечалось небольшое увеличение площади общей измененной кожи с последующей динамикой уменьшения до конца эксперимента. При этом данные по площади общей измененной кожи были значительно ниже в группе КС и статистически достоверны по сравнению с группой К с 14 по 105 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$); по сравнению с группами Д и ДКС статистически достоверные различия регистрировали с начала эксперимента по 91 сутки ($p \leq 0,05$). В группе К статистически достоверные различия отмечались в момент ее нахождения на «плато» с 35 по 84 сутки по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$).

При оценке площади язвенной поверхности также отмечали общую тенденцию к ее уменьшению во всех группах (К, КС, Д, ДКС), однако регистрировали увеличение площади с 56 по 91 сутки в группе Д на 45,32% (с $1,39 \pm 0,45$ до $2,02 \pm 1,12$ см²) и с 42 по 77 сутки в группе К на 105,8% (с $1,90 \pm 0,28$ до $3,91 \pm 0,97$ см²) (Рисунок 2, Таблица 3).

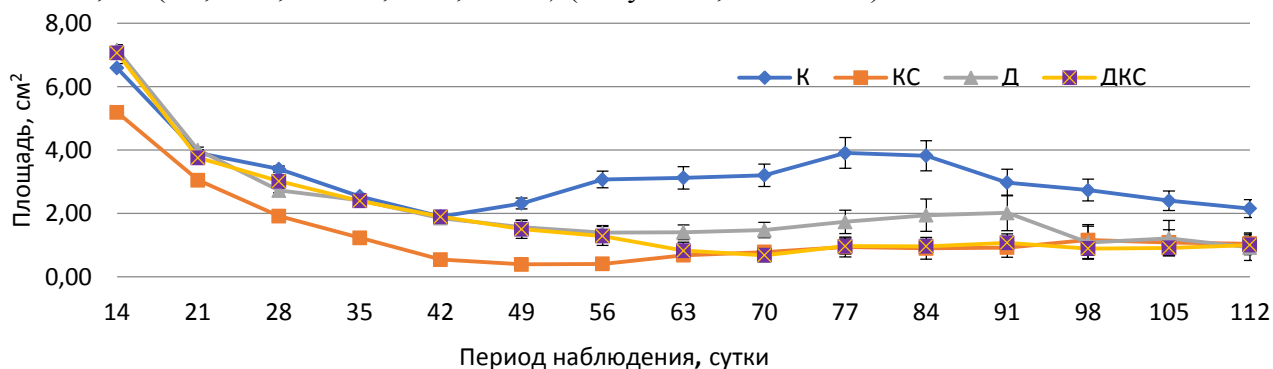


Рисунок 2 - Динамика развития язвенной поверхности кожи у животных при МЛП в группах К, КС, Д, ДКС

Таблица 3 - Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д и ДКС, см²

Сутки	К	КС	Д	ДКС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	7,16±0,32#	7,06±0,31#
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	4,00±0,20#	3,56±0,22#
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	2,73±0,14*#	3,02±0,25#
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,42±0,21#	2,40±0,25#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	1,85±0,33#	1,90±0,37#
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	1,57±0,42#	1,50±0,58*
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	1,39±0,45*#	1,29±0,59*
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	1,41±0,47*	0,83±0,52*
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	1,47±0,49*	0,68±0,41*
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	1,74±0,74	0,97±0,50*
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	1,95±1,02*	0,96±0,45*
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,02±1,12	1,08±0,57*
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	1,08±1,04*	0,90±0,63*
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	1,22±1,13	0,92±0,47*
112	2,15±0,57	1,04±0,68	0,93±0,83*	1,01±0,56
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	87	85,7

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Д и ДКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$)

При этом статистически достоверные различия были обнаружены в группе КС по сравнению с группой К с 14 по 105 сутки ($p \leq 0,05$); по сравнению с группой Д и ДКС с 14 по 56 и 42 сутки, соответственно ($p \leq 0,05$). Различие площади язвенной поверхности также было статистически достоверным в группе К по сравнению с группой ДКС с 49 по 105 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). Между группой К и группой Д также были статистически достоверные различия в промежуток с 28 по 112 сутки ($p \leq 0,05$), но не во все дни. Происходило чередование наличия и отсутствия достоверных различий, что может быть связано с незначительным волнообразным течением заживления язвенной поверхности в группе Д в промежуток с 70 по 112 сутки. С 70 суток до 112 сутки в группах Д, ДКС и КС по сравнению с Контролем отмечалось достоверное сокращение язвенной поверхности МЛП ($p \leq 0,05$). Статистически достоверных различий в оценке язвенной поверхности между группой Д и ДКС обнаружено не было. Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группе К и КС сократилась на 67,4% и 80% К (с $6,59 \pm 0,28$ до $2,15 \pm 0,57$ см²; с $5,19 \pm 0,33$ до $1,04 \pm 0,68$ см² соответственно, $p \leq 0,05$), в группе Д и ДКС на 87% и 85,7% (с $7,16 \pm 0,32$ до $0,93 \pm 0,83$; с $7,06 \pm 0,31$ см² до $1,01 \pm 0,56$ см² соответственно, $p \leq 0,05$).

Статистический анализ площади общей измененной поверхности кожи не показал достоверных различий в группе ДК по сравнению с группами К и ДКС. Достоверные различия во все дни эксперимента были отмечены в группе КС по сравнению с группами ДК и ДКС ($p = 0,05$). Между группами К и ДКС достоверные различия были зарегистрированы лишь в 7, 21, 42 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3, Таблица 4).

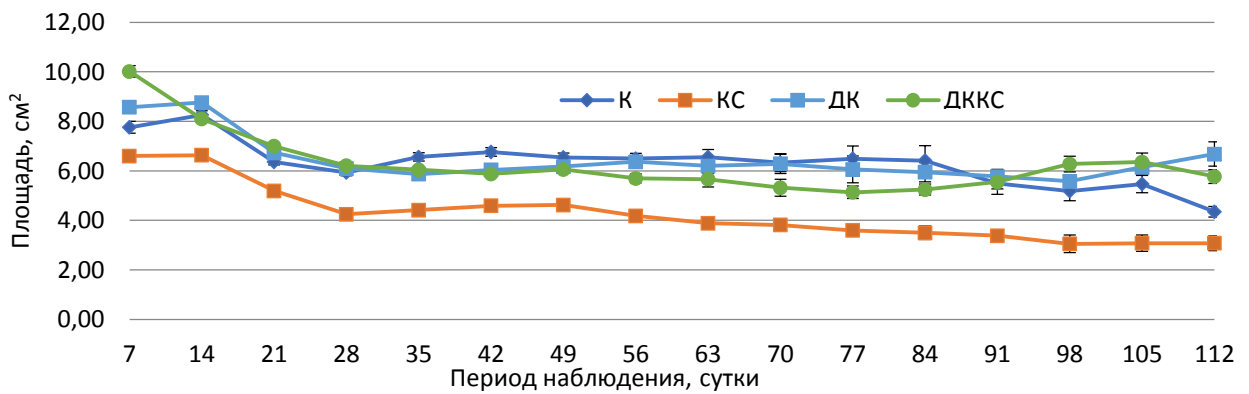


Рисунок 3 - Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС.

Таблица 4 - Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС, см²

0	К	КС	ДК	ДККС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	8,57±0,50#	10,02±0,46*#
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,76±0,47#	8,09±0,26#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,73±0,29#	7,0±0,20*#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	6,10±0,28#	6,21±0,18#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,87±0,28#	6,04±0,19#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	6,04±0,47#	5,88±0,22*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	6,18±0,33#	6,06±0,30#
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	6,37±0,48#	5,70±0,35#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	6,20±0,59#	5,66±0,62#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	6,28±0,78#	5,32±0,68#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	6,06±1,09#	5,13±0,50#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,95±0,77#	5,25±0,45#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,77±0,59#	5,55±0,56#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	5,58±0,53#	6,28±0,63#
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	6,15±0,57#	6,36±0,73#
112	4,35±0,42	3,07±0,60	6,68±0,99#	5,77±0,56#

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп ДК и ДККС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$).

При оценке площади язвенной поверхности статистически достоверные различия были обнаружены в группе КС с 14 по 49 сутки эксперимента по сравнению с группой ДККС ($p \leq 0,05$) и с 14 по 98 и в 112 сутки эксперимента по сравнению с группой ДК ($p \leq 0,05$). В группе К основные статистические различия ($p \leq 0,05$) были зарегистрированы с 49 по 84 сутки по отношению к группе ДККС и в 21 и 28 сутки по отношению к группе ДК. В группах ДК и ДККС отмечали увеличение площади язвенной поверхности с 63 по 112 дни эксперимента, при этом между группами ДК и ДККС достоверные различия были обнаружены в 28, 42, 63 и 70 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). Язвенная поверхность в группах ДК и ДККС в период с 14 по 112 сутки была сокращена на 60,2% и 50,4% (Рис. 4, Таблица 5).

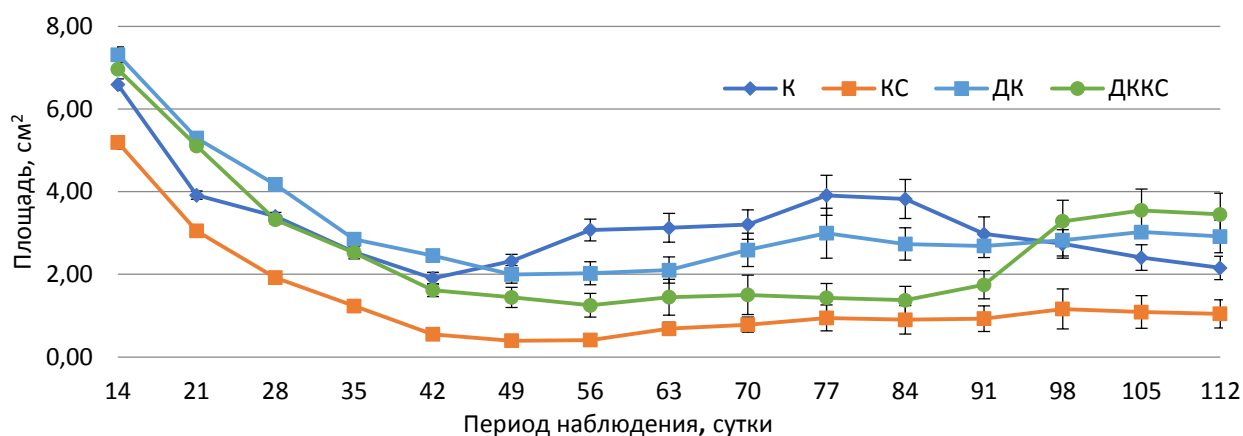


Рисунок 4 - Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК, ДККС

Таблица 5 - Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС, см²

Сутки	К	КС	ДК	ДККС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	7,31±0,38	6,96±0,19
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	5,3±0,23*#	5,11±0,18*#
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	4,17±0,22*#	3,32±0,21#&
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,85±0,27#	2,52±0,30#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	2,45±0,27#	1,62±0,31#&
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	2,00±0,42#	1,44±0,49*#
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	2,03±0,56#	1,25±0,57*
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	2,10±0,63#	1,45±0,87*#&
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	2,59±0,81#	1,50±0,95*#&
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	3,00±1,21#	1,43±0,70*
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	2,73±0,79#	1,37±0,66*
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,69±0,56#	1,75±0,68
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	2,83±0,76#	3,28±1,02
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	3,02±0,30	3,55±1,03
112	2,15±0,57	1,04±0,68	2,91±0,79	3,45±1,03#
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	60,2	50,4

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп ДК и ДККС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & - достоверные различия между группой ДККС и ДК ($p \leq 0,05$)

Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группах ДК и ДККС сократилась на 60,2% и 50,4% К (с $7,31 \pm 0,38$ см² до $2,91 \pm 0,79$ см²; с $6,96 \pm 0,19$ см² до $3,45 \pm 1,03$ см² соответственно, $p \leq 0,05$) по сравнению с группой Контроля 67,4% (с $6,59 \pm 0,28$ см² до $2,15 \pm 0,57$ см²).

Наблюдали статистически достоверные различия при оценке общей измененной площади кожи в зоне моделирования МЛП в группе КС по сравнению с группами Пл (с 7 по 112 сутки ($p \leq 0,05$)) и ПКС (с 7 по 91 сутки ($p \leq 0,05$)).

В последний сутки эксперимента группы Пл и ПКС были достоверно различны по сравнению с группой К ($p \leq 0,05$), при этом значения общей измененной площади в группе Пл оставались значительно выше других групп (К, КС, ПКС). Между группами Пл и ПКС различия наблюдали только в 105 и 112 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$) (Рисунок 5, Таблица 6).

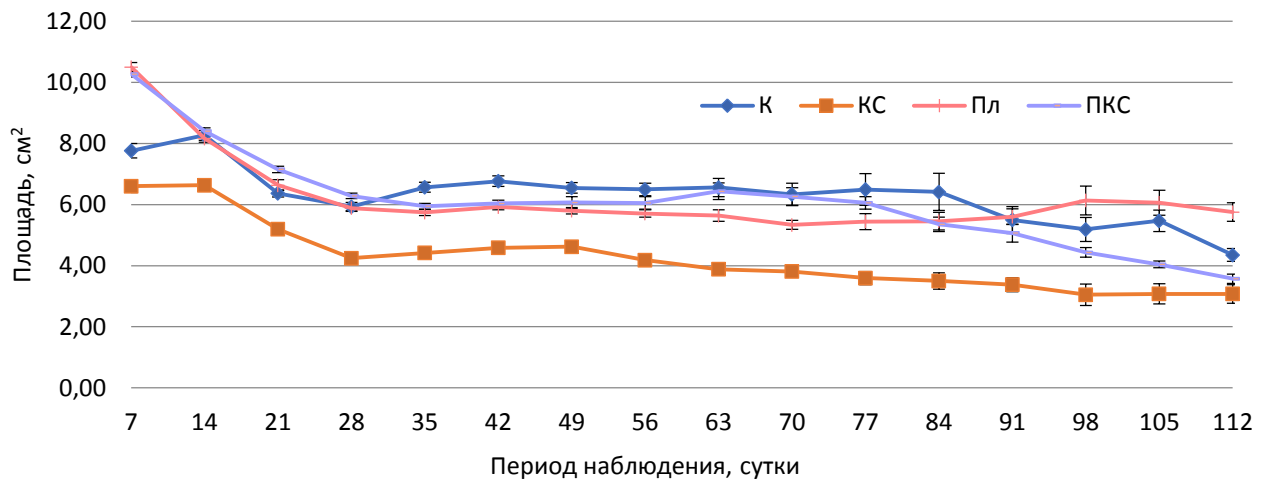


Рисунок 5 - Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС

Таблица 6 - Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС, см²

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	10,50±0,31*#	10,27±0,19*#
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,16±0,25#	8,41±0,21#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,63±0,36#	7,15±0,20*#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	5,88±0,22#	6,28±0,18#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,74±0,21#	5,95±0,19#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	5,92±0,19*#	6,04±0,21*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	5,80±0,21*#	6,06±0,39#
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	5,71±0,24#	6,05±0,41#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	5,64±0,37#	6,43±0,54#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	5,33±0,29#	6,26±0,28#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	5,44±0,53#	6,06±0,41#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,45±0,58#	5,36±0,47#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,60±0,52#	5,07±0,58#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	6,13±0,95#	4,43±0,31
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	6,06±0,81#	4,04±0,23*&
112	4,35±0,42	3,07±0,60	5,75±0,61*#	3,57±0,30*&

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & - достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

С 14 по 56 сутки эксперимента площадь язвенной поверхности в группах Пл и ПКС статистически достоверно различалась по сравнению с группой КС. На 63 сутки в группе Пл выявляли максимальное сокращение площади язвенной поверхности по сравнению с группой К ($1,63 \pm 0,46 \text{ см}^2$ и $3,12 \pm 0,70 \text{ см}^2$, $p \leq 0,05$), после чего в группе Пл отмечалось увеличение площади язвенной поверхности до максимального значения на 112 сутки ($3,52 \pm 1,14 \text{ см}^2$).

На 112 сутки в группе ПКС регистрировали достоверное сокращение язвенной поверхности по сравнению с К ($0,31 \pm 0,18 \text{ см}^2$ и $2,15 \pm 0,57 \text{ см}^2$, $p \leq 0,05$) (Рисунок. 6, Таблица 7).

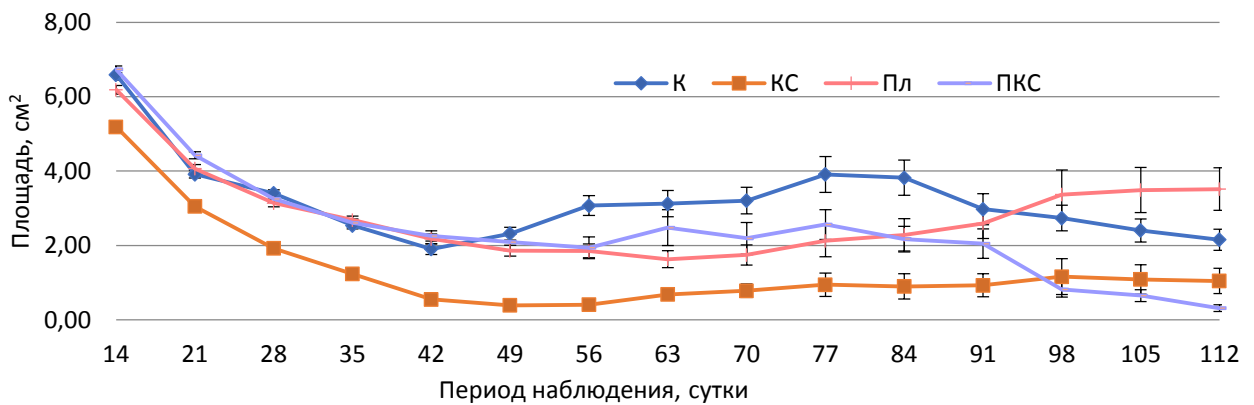


Рисунок 6 - Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл, ПКС

Таблица 7 - Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС, см²

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	6,19±0,23#	6,73±0,18#
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	4,07±0,22#	4,42±0,19*#
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	3,14±0,20#	3,25±0,18#
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,68±0,21#	2,60±0,21#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	2,17±0,27#	2,25±0,27#
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	1,86±0,29#	2,09±0,42#
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	1,85±0,37#	1,94±0,59*#
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	1,63±0,46*	2,48±0,96
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	1,74±0,55	2,19±0,86
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	2,12±0,86	2,56±0,80
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	2,28±0,87#	2,17±0,69
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,60±0,81#	2,05±0,80
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	3,37±1,32	0,82±0,40*
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	3,49±1,21	0,65±0,32*
112	2,15±0,57	1,04±0,68	3,52±1,14#	0,31±0,18*&
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	43,1	95,4

Примечания: * - достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & - достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

В группе ПКС отмечали уменьшение площади формирования язвенной поверхности с незначительным волнообразным течением с 56 по 84 сутки по сравнению с группой К на 21, 56, 98-112 сутки ($p \leq 0,05$). Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группах Пл и ПКС сократилась на 43,1% и 95,4% (с $6,19 \pm 0,23$ см² до $3,52 \pm 1,14$ см²; с $6,73 \pm 0,18$ см² до $0,31 \pm 0,18$ см² соответственно, $p \leq 0,05$) по сравнению с группой Контроля 67,4% (с $6,59 \pm 0,28$ до $2,15 \pm 0,57$ см²).

Сравнение групп с интрадермальным введением МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека с группами с интрадермальным введением МСК плаценты человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека

Проведено сравнение между группами, где в терапии использовались МСК человека и их паракринные факторы. Значение площади общей измененной поверхности кожи в группе Пл

увеличилось с 77 по 112 сутки, в то время как в остальных группах отмечалось уменьшение площади. В группах Д, ДКС и ПКС прослеживалась схожая динамика уменьшения площади общей измененной поверхности кожи (Рисунок 7, Таблица 8). Заживление язвенной поверхности к концу эксперимента отмечалось меньше в группе Пл – $3,52 \pm 1,14 \text{ см}^2$, что достоверно различно только по сравнению с группой ПКС $0,31 \pm 0,18 \text{ см}^2$ ($p \leq 0,05$). Схожая динамика заживления наблюдалась в период с 14 по 56 сутки во всех группах, после чего регистрировали рецидивирующее увеличение площади в группах Д, ПКС до 91 суток и в группе Пл до 112 дня.

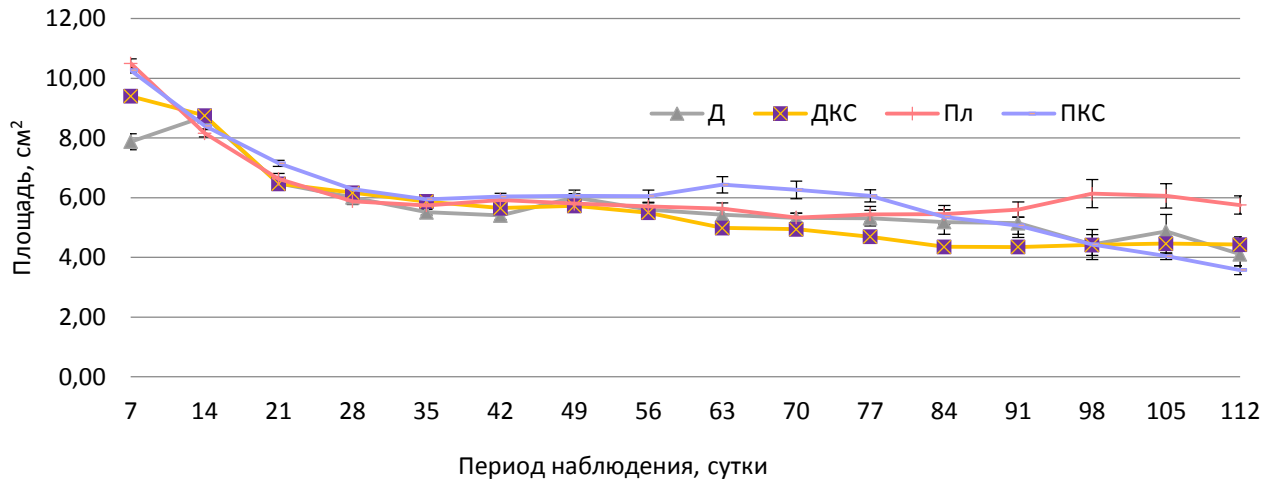


Рисунок 7 - Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС

Таблица 8 - Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС, см^2

	Д	ДКС	Пл	ПКС
7	$7,87 \pm 0,54$	$9,40 \pm 0,39 \# \&1$	$10,50 \pm 0,31 * \#$	$10,27 \pm 0,19 * \#$
14	$8,72 \pm 0,35 \#$	$8,75 \pm 0,34 \#$	$8,16 \pm 0,25$	$8,41 \pm 0,21$
21	$6,48 \pm 0,18 \#$	$6,46 \pm 0,24 \#$	$6,63 \pm 0,36$	$7,15 \pm 0,20 * \#$
28	$6,01 \pm 0,20 \#$	$6,17 \pm 0,28 \#$	$5,88 \pm 0,22$	$6,28 \pm 0,18$
35	$5,51 \pm 0,19 * \#$	$5,87 \pm 0,27 * \#$	$5,74 \pm 0,21 *$	$5,95 \pm 0,19 *$
42	$5,40 \pm 0,28 * \#$	$5,65 \pm 0,30 * \#$	$5,92 \pm 0,19 *$	$6,04 \pm 0,21 *$
49	$6,01 \pm 0,25 \#$	$5,73 \pm 0,41 * \#$	$5,80 \pm 0,21$	$6,06 \pm 0,39$
56	$5,60 \pm 0,24 \#$	$5,50 \pm 0,38 * \#$	$5,71 \pm 0,24$	$6,05 \pm 0,41$
63	$5,43 \pm 0,32 \#$	$4,49 \pm 0,26 * \#$	$5,64 \pm 0,37 \#$	$6,43 \pm 0,54 \#$
70	$5,32 \pm 0,32 \#$	$4,94 \pm 0,19 \#$	$5,33 \pm 0,29$	$6,26 \pm 0,28$
77	$5,31 \pm 0,53 \#$	$4,69 \pm 0,15 * \#$	$5,44 \pm 0,53$	$6,06 \pm 0,41 \#$
84	$5,19 \pm 0,83 \#$	$4,35 \pm 0,17 * \#$	$5,45 \pm 0,58$	$5,36 \pm 0,47 \#$
91	$5,15 \pm 0,96 \#$	$4,35 \pm 0,33 \#$	$5,60 \pm 0,52 \#$	$5,07 \pm 0,58$
98	$4,43 \pm 1,01$	$4,42 \pm 0,69$	$6,13 \pm 0,95$	$4,43 \pm 0,31$
105	$4,87 \pm 1,13$	$4,46 \pm 0,68$	$6,06 \pm 0,81$	$4,04 \pm 0,23 \&2$
112	$4,10 \pm 0,78$	$4,43 \pm 0,53$	$5,75 \pm 0,61$	$3,57 \pm 0,30 \&2$

Примечания: * - достоверные различия по отношению к группе Д ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$), &1 – достоверные различия между группой ДКС и Д ($p \leq 0,05$), &2- достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

Максимальное увеличение площади поражения в этот период в группе Д выявлено на 45,3%, в группе ПКС на 5,7% и в группе Пл на 90,3%. Достоверные различия были отмечены в группе Пл по сравнению с группой Д на 14 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$); с группой ДКС в 14,

35 и с 49 по 70 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). В группе ПКС достоверные различия наблюдали в 21 и 28 сутки эксперимента по сравнению с группой Д ($p \leq 0,05$); также на 14, 21 и с 49 по 63 сутки в сравнении с группой ДКС (Рисунок 8, Таблица 9).

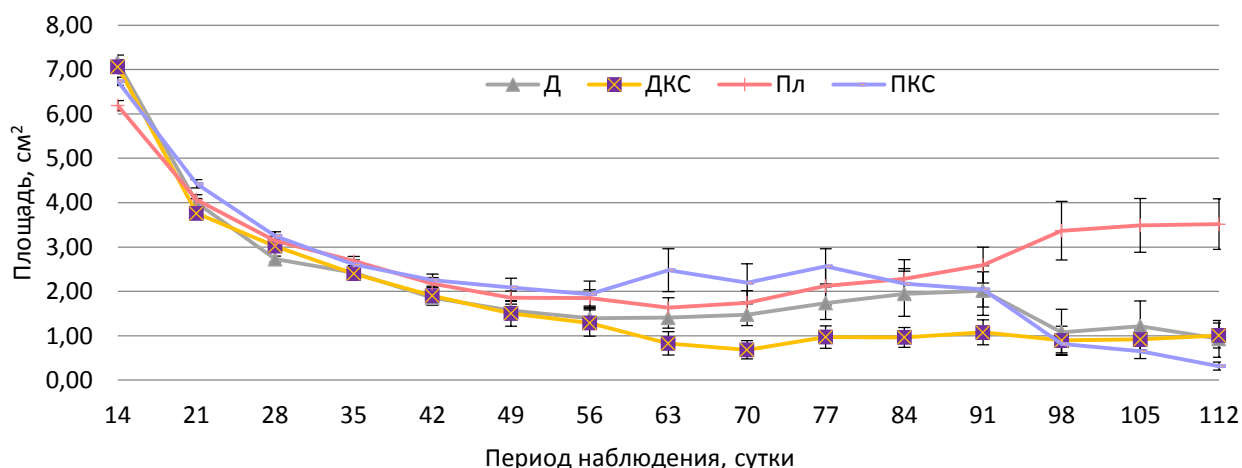


Рисунок 8 - Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл, ПКС

Таблица 9 - Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС, см²

Сутки	Д	ДКС	Пл	ПКС
14	7,16±0,32#	7,06±0,31#	6,19±0,23*	6,73±0,18#
21	4,00±0,20#	3,76±0,22#	4,07±0,22#	4,42±0,19#
28	2,73±0,14*#	3,02±0,25#	3,14±0,20	3,25±0,18*
35	2,42±0,21#	2,40±0,25#	2,68±0,21#	2,60±0,21*
42	1,85±0,33#	1,90±0,37#	2,17±0,27	2,25±0,27
49	1,57±0,42#	1,50±0,58*	1,86±0,29#	2,09±0,42#
56	1,39±0,45*#	1,29±0,59*	1,85±0,37#	1,94±0,59#
63	1,41±0,47*	0,83±0,52*	1,63±0,46#	2,48±0,96#
70	1,47±0,49*	0,68±0,41*	1,74±0,55#	2,19±0,86
77	1,74±0,74	0,97±0,50*	2,12±0,86	2,56±0,80
84	1,95±1,02*	0,96±0,45*	2,28±0,87	2,17±0,69
91	2,02±1,12	1,08±0,57*	2,60±0,81	2,05±0,80
98	1,08±1,04*	0,90±0,63*	3,37±1,32	0,82±0,40
105	1,22±1,13	0,92±0,47*	3,49±1,21	0,65±0,32
112	0,93±0,83*	1,01±0,56	3,52±1,14	0,31±0,18 &2
% сокращения 14/112 сутки	87	85,7	43,1	95,4

Примечания: * - достоверные различия по отношению к группе Д ($p \leq 0,05$), # - достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$), &2- достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

Таким образом, наибольшее сокращение язвенной поверхности кожи, образованной в результате воздействия ионизирующего излучения к 112 дню наблюдали в группах ПКС – 95,4%, ДКС – 85,7%, Д – 87% аналогично с группой положительного контроля КС – 80%. Различная динамика заживления площади повреждения в группах КС, Д и ДКС возможно связана с рецидивирующими процессами МЛП, которые были менее выражены, чем в других группах (К, ДК, ДКС, Пл). В группах К, ДК, ДКС и Пл отмечалось сокращение площади язвенной поверхности на 67,4%, 60,2%, 50,4% и 43,1%, соответственно. Количество животных с полностью зажившим язвенным дефектом на 112 сутки составило 0% в группе К и ДК, 20% в

группах ДКС, ДККС и Пл, по 40% животных в группах КС и ПКС, а в группе Д количество животных с полностью зажившим ожогом составило 60%.

Исследование гистологических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП

В норме без патологии биоптат кожи лабораторных животных при гистологическом исследовании представляет собой полнотелый фрагмент кожи лабораторных животных представляет собой биоптат с подлежащей подкожной мышцей обычного гистологического строения, с сохранным количеством волосяных фолликулов в дерме.

На 28 сутки во всех группах после облучения формировался открытый раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. В подлежащей дерме в области дна дефекта определялась слабая, преимущественно периваскулярная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация с примесью единичных нейтрофильных гранулоцитов и умеренно выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. По краям раневого дефекта отмечалось умеренное утолщение прилежащего неповрежденного эпидермиса толщиной в 6-7 слоев эпителиоцитов с признаками вакуольной дистрофии во всех исследуемых группах. Отличительной чертой группы ДКС являлось утолщение в 5-6 слоев, а в группе К в 11-12 слоев эпителиоцитов. Также регистрировались немногочисленные внутриэпидермальные лимфоциты.

На 112 сутки в группе К в большинстве образцов сохранялся обширный раневой дефект кожи, в области дна дефекта – выраженные гнойно-некротические изменения. Подлежащая соединительная ткань с умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, выраженными фиброзными изменениями, очаговым отеком и умеренно выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Большая подкожная мышца обычного гистологического строения с явлениями умеренного отека. В области краев раневого дефекта отмечали участки регенерации покровного эпителия толщиной в 1-2 эпителиоцита. Прилежащий эпидермис умеренно утолщен до 6-7 слоев клеток, в некоторых случаях до 10-12 слоев клеток.

Дефект кожи в извлеченных биоптатах группы КС в 2/3 случаев на 112 сутки эксперимента был полностью или частично эпителизован. В случаях полной эпителизации толщина эпителиального пласта составляла от 5 до 7 клеток. Подлежащая дерма была фиброзирована, фиброз более выражен в субэпителиальных отделах. В отдельных случаях с некрозами в поверхностных отделах и скоплениями гемоксидерофагов в более глубоких отделах. Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения с очаговым фиброзированием. Также отмечали зачатки волосяных фолликулов в количестве 1-3 в поле зрения ($\times 10$). В одном из образцов сохранялся обширный дефект кожи, достигающий до подкожно-жировой клетчатки, и покрытый гнойно-некротической корочкой. Жировая клетчатка в области дна дефекта с выраженными фиброзными изменениями, умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью немногочисленных нейтрофилов и слабовыраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла и полнокровием капилляров.

В группе Д в последний сутки эксперимента дефект кожи был полностью или частично эпителизован, толщина эпителиального пласта при это составляла от 5 до 7 слоев клеток. Подлежащая дерма фиброзирована, фиброз был более в субэпителиальных отделах. Имелись зачатки волосяных фолликулов в количестве от 2 до 4 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения, либо полностью фиброзированы в центральных отделах, а ближе к периферии – обычного гистологического строения с мелкоочаговым фиброзированием. Воспалительные изменения отсутствовали. В 1/3 образцов дефект кожи был также частично эпителизован с толщиной вновь образованного эпителиального пласта от 5 до 8 клеток, однако подлежащая дерма была со слабой периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией. В ней определялись волосяные фолликулы в количестве от 1 до 2 в поле зрения ($\times 20$). В центральных отделах – дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. В подлежащей дерме определяли фиброз с умеренной лимфо-

плазмоцитарной инфильтрацией. Поперечнополосатая мышца в центральных отделах была полностью фиброзирована, а ближе к периферии – обычного гистологического строения.

В группе ДКС на 112 сутки эпидермис был очагово умеренно утолщен до 5-6 слоев клеток, регистрировали очаговый гиперкератоз. Сохранялся одиночный дефект эпидермиса, покрытый гнойно-некротической корочкой. В поверхностных отделах дермы наблюдали умеренно выраженную лимфоцитарную инфильтрацию с примесью нейтрофилов, микроабсцессы, зоны некроза дермы и подкожной мышцы, а также созревающие грануляции, умеренно выраженный фиброз, полнокровие капилляров и диапедезные кровоизлияния. Волосные фолликулы немногочисленны, без воспалительной инфильтрации. Большая подкожная мышца была обычного гистологического строения.

Обширный дефект кожи, достигающий подкожно-жировой клетчатки наблюдали в 112 сутки в группе ДК. Сам дефект был покрыт гнойно-некротической корочкой и представлен некротизированной дермой, большой подкожной мышцей. Дно дефекта с выраженным отеком, по периферии некротизированной ткани – «ободок» из скоплений нейтрофилов и колоний микроорганизмов. Соединительная ткань с выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, грануляциями и выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Прилежащий эпидермис был утолщен до 6-7 слоев клеток (в некоторых случаях до 10-12) с признаками выраженной дистрофии кератиноцитов и явлениями акантоза.

В группе ДККС на 112 сутки эксперимента в 2/3 образцов также сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой и достигающий подкожно-жировой клетчатки. Дно и края раневого дефекта были представлены соединительной тканью и поперечнополосатой мышцей с процессами фиброирования, грануляциями, выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла и выраженной лимфо-плазматической инфильтрацией с примесью нейтрофилов. Прилежащий эпидермис был утолщен до 6-7 слоев клеток, с признаками выраженной дистрофии. В 1/3 образцов дефект кожи был полностью эпителизирован, толщина эпителиального пласта составляла от 5 до 8 слоев клеток. Подлежащая дерма с явлениями субэпителиального отека. В периферических отделах регистрировали зачатки волосных фолликулов в количестве от 1 до 3 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения с очаговым фиброзом. Воспалительные изменения отсутствовали.

В группе Пл в последний сутки эксперимента во всех образцах сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. Дно дефекта было представлено фиброзированной соединительной тканью с грануляциями, выраженной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью гранулоцитов, поперечнополосатая ткань в дне дефекта не определялась. Отмечали выраженную пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла и обширные участки фиброза подкожно-жировой клетчатки. Эпидермис в краях раневого дефекта утолщен (до 8-10 слоев клеток), с признаками вакуольной дистрофии, пролиферацией волосных фолликулов.

К 112 дню эксперимента в группе ПКС в 1/3 образцов сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой и достигающий подкожно-жировой клетчатки. Дно и края дефекта представлены соединительной тканью, жировой клетчаткой и поперечнополосатой мышечной тканью с фиброзами, умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией и пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Прилежащий эпидермис утолщен (до 6-7 слоев клеток), с признаками выраженной дистрофии. Отмечали частичную эпителизацию раневого дефекта в области краев раны в виде вновь образованного эпителиального пласта в 3-4 эпителиоцита. В 2/3 образцов дефект кожи был полностью эпителизирован, толщина эпителиального пласта составила от 5 до 8 клеток. Подлежащая дерма была очагово фиброзирована. Имеются зачатки волосных фолликулов от 1 до 3 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и центральных отделах не определяется – замещена соединительной тканью. Воспалительные изменения отсутствовали.

Таким образом, анализ гистологического исследования подтверждает полученные данные по эффективности применения проведенной терапии в группах животных.

Исследование иммуногистохимических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП оценка биоптатов кожи

Иммуногистохимический маркер CD31 – маркер, принимающий участие в процессах ангиогенеза, является прогностическим маркером вновь образованных сосудов, он опосредует адгезию клеток к эндотелиальным клеткам и способствует диапедезу фагоцитов – прохождению через эндотелиальную стенку сосудов в район развития воспалительной реакции. В результате иммуногистохимического исследования установлено, что количество вновь образованных сосудов, в эндотелиальных клетках которых определялась экспрессия CD31, статистически достоверно увеличивалась с 28 по 112 сутки только в группе ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $17,87 \pm 1,8$ ($p \leq 0,05$)), что свидетельствовало об усилении неоангиогенеза к концу эксперимента (Таблица 10).

К концу эксперимента отмечали статистически достоверное увеличение клеток макрофагального ряда в тканях, окружающих язвенный дефект, отмеченных маркером CD68, в группах К и ДК (с $11,7 \pm 1,4$ до $24,7 \pm 2,4$ и с $16,6 \pm 2,3$ до $31,1 \pm 3,9$, соответственно ($p \leq 0,05$)).

Определяли и количество FVIII-меченных клеток в строме и сосудах маркера, используемого для дифференцировки эндотелиальных клеток. В ходе исследования не было отмечено достоверных различий между 28 и 112 днем эксперимента в количестве FVIII-меченных клеток в строме, однако отмечали достоверные различия в сосудах. Так происходило увеличение количества FVIII-меченных клеток в группах К (с $5,53 \pm 0,9$ до $10,87 \pm 1,5$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $5,80 \pm 1,1$ до $11,5 \pm 1,7$ ($p \leq 0,05$)), ДКС (с $8,03 \pm 0,9$ до $21,63 \pm 3,0$ ($p \leq 0,05$)) и ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $14,13 \pm 2,1$ ($p \leq 0,05$)).

Количество вновь образованных немиелинизированных нервных волокон в коже, экспрессирующих маркер PGP 9.5, к концу эксперимента увеличилось в группах К (с $1,97 \pm 0,3$ до $6,47 \pm 1,1$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $1,97 \pm 0,3$ до $5,70 \pm 1,0$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $1,87 \pm 0,4$ до $4,40 \pm 0,9$ ($p \leq 0,05$)) и ДККС (с $1,83 \pm 0,3$ до $2,60 \pm 0,4$ ($p \leq 0,05$)).

Таблица 10 - Абсолютное количество маркеров ИГХ в образцах иссеченных тканей кожного дефекта кожи животных на 10 полей зрения

Маркер	День	К	КС	Д	ДКС	ДК	ДККС	Пл	ПКС
CD31	28	$13,97 \pm 2,0$	$15,87 \pm 1,1$	$6,0 \pm 1,2$	$19,1 \pm 1,1$	$5,53 \pm 0,9$	$12,2 \pm 1,6$	$2,6 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,6$
	112	$17,47 \pm 1,3$	$13,1 \pm 1,8$	$12,75 \pm 2,1^*$	$28,67 \pm 2,7$	$17,87 \pm 1,8^*$	$12,53 \pm 2,4$	$10,97 \pm 1,7^*$	$8,2 \pm 1,8$
CD68	28	$11,7 \pm 1,4$	$22,2 \pm 1,6$	$7,7 \pm 0,9$	$24,0 \pm 1,7$	$16,6 \pm 2,3$	$11,4 \pm 1,5$	$12,9 \pm 1,9$	$24,0 \pm 3,6$
	112	$24,7 \pm 2,4^*$	$13,1 \pm 1,8$	$9,8 \pm 1,6$	$20,9 \pm 2,5$	$31,1 \pm 3,9^*$	$25,7 \pm 3,9^*$	$29,3 \pm 4,3^*$	$24,8 \pm 4,1$
PGP 9.5	28	$1,97 \pm 0,3$	$1,97 \pm 0,3$	$1,87 \pm 0,4$	$2,03 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$	$1,83 \pm 0,3$	$2,65 \pm 0,5$	$2,77 \pm 0,5$
	112	$6,47 \pm 1,1^*$	$5,7 \pm 1,0^*$	$4,40 \pm 0,9^*$	$3,03 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,4^*$	$4,63 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,9$
FVIII стромы	28	$7,87 \pm 1,8$	$8,0 \pm 1,8$	$9,0 \pm 1,4$	$17,5 \pm 2,6$	$10,7 \pm 1,6$	$10,17 \pm 1,5$	$6,80 \pm 1,3$	$10,97 \pm 2,3$
	112	$15,83 \pm 2,0$	$7,03 \pm 1,1$	$8,87 \pm 1,5$	$14,67 \pm 1,8$	$22,47 \pm 3,4$	$14,37 \pm 3,1$	$16,07 \pm 2,2$	$10,17 \pm 1,6$
FVIII сосуды	28	$5,3 \pm 0,9$	$5,80 \pm 1,1$	$6,23 \pm 1,4$	$8,03 \pm 0,9$	$5,53 \pm 0,9$	$12,7 \pm 1,6$	$2,55 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,7$
	112	$10,87 \pm 1,5^*$	$11,5 \pm 1,7^*$	$7,93 \pm 1,6$	$21,63 \pm 3,0^*$	$14,13 \pm 2,1^*$	$10,9 \pm 2,4$	$9,03 \pm 1,5$	$7,57 \pm 1,6$
Ki67+ стромы	28	$5,33 \pm 0,5$	$12,0 \pm 3,1$	$6,56 \pm 1,2$	$9,56 \pm 2,0$	$3,11 \pm 0,3$	$3,11 \pm 0,3$	$2,83 \pm 0,3$	$4,67 \pm 0,6$
	112	$26,11 \pm 2,8^*$	$27,56 \pm 5,7$	$23,22 \pm 2,9^*$	$7,33 \pm 2,0$	$12,67 \pm 1,0^*$	$15,0 \pm 3,8^*$	$13,11 \pm 2,0$	$12,78 \pm 3,6$
Ki67+ сосуды	28	$2,33 \pm 0,3$	$2,67 \pm 0,6$	$2,22 \pm 0,3$	$1,89 \pm 0,4$	$1,22 \pm 0,1$	$1,67 \pm 0,2$	$1,33 \pm 0,2$	$2,11 \pm 0,3$
	112	$11,78 \pm 0,8^*$	$8,22 \pm 1,7$	$5,56 \pm 1,3$	$1,78 \pm 0,4^*$	$2,44 \pm 0,3$	$2,11 \pm 0,3$	$4,0 \pm 1,3$	$4,33 \pm 1,5$

Примечание: * - наличие статистически достоверных различий между 28 и 112 днем эксперимента внутри группы, $p \leq 0,05$.

Пролиферативную активность клеток стромы и эндотелия сосудов определяли с помощью уровня экспрессии маркера пролиферации Ki67 – ядерного белка, который экспрессируется во всех активных фазах клеточного деления, но отсутствует в покоящихся клетках. В ходе эксперимента в сосудистой строме выявлено достоверное постепенное увеличение количества Ki67+ пролиферирующих клеток в группах К (с $2,3 \pm 0,3$ до $11,78 \pm 0,8$ ($p \leq 0,05$)), ДК (с $1,22 \pm 0,1$ до $2,44 \pm 0,3$ ($p \leq 0,05$)). В строме число клеток, содержащих в себе Ki67+ увеличивалось с 28 по 112 сутки эксперимента в группах К (с $5,33 \pm 0,5$ до $26,11 \pm 2,8$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $6,56 \pm 1,2$ до

23,22±2,9 ($p \leq 0,05$)), ДК (с 3,11±0,3 до 12,67±1,0 ($p \leq 0,05$)), ДККС (с 3,11±0,3 до 15,0±3,8 ($p \leq 0,05$)).

Следующие маркеры иммуногистохимического исследования оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия (Таблица 11).

Установлено, что уровень экспрессии Ag к Collagen I типа увеличивался с 28 по 112 сутки во всех группах, при этом уровень экспрессии Collagen III типа уменьшался между 28 и 112 днем эксперимента во всех группах за исключением группы ПКС, в которой выраженность экспрессии оставалась неизменной.

Интенсивность экспрессии VEGF в эндотелиальных клетках сосудов уменьшался к 112 суткам в группах К, КС, Пл и ПКС; увеличивалась в группах Д, ДК, ДККС и оставалась неизменной в группе ДКС. Экспрессия маркера VEGF в строме также уменьшалась в группах К, КС, Пл и в группе ДКС. В группе Д, ДК, ДККС отмечали повышение экспрессии, а в группе ПКС не отмечалось изменений в уровне экспрессии.

Выраженность экспрессии TIMP в клетках увеличивалась к 112 дню в группах К, КС, Д, ДКС, ДК и уменьшалась в группе Пл. Уровень экспрессии в группах ДККС и ПКС в 28 и 112 сутки эксперимента оставался неизменным.

При оценке интенсивности экспрессии MMP 2 типа отмечали ее снижение к концу эксперимента в группах К, КС, ДКС, Пл, увеличение экспрессии происходило в группах Д, ДК, ДККС и группе ПКС. При этом уровень экспрессии MMP 9 типа снижался во всех группах кроме ПКС, где отмечали повышение уровня экспрессии.

Таблица 11 - Оценка экспрессии маркеров ИГХ в образцах иссеченных тканей кожного дефекта кожи животных

Маркер	День	К	КС	Д	ДКС	ДК	ДККС	Пл	ПКС
Collagen I	28	1,0±0,0	1,33±0,33	1,0±0,0	2,0±0,0	1,33±0,33	1,33±0,33	1,0±0,0	1,33±0,33
	112	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,33±0,33	2,67±0,00	2,33±0,33	1,33±0,33	2,0±0,58
Collagen III	28	2,67±0,33	2,0±0,0	2,67±0,33	3,0±0,0	3,0±0,33	2,67±0,33	2,50±0,5	2,33±0,33
	112	2,33±0,33	1,33±0,33	1,67±0,33	2,0±0,0	2,0±0,58	1,67±0,33	2,0±0,58	2,33±0,33
VEGF Эндотелий	28	2,67±0,33	2,33±0,33	1,67±0,33	2,67±0,33	2,33±0,67	2,0±0,33	2,5±0,5	2,0±0,0
	112	2,0±0,33	1,33±0,33	2,33±0,33	2,67±0,33	2,67±0,33	2,0±0,33	2,0±0,0	1,33±0,33
VEGF стромы	28	2,33±0,33	2,0±0,0	1,0±0,0	2,67±0,33	1,67±0,33	1,33±0,33	2,0±0,0	1,0±0,0
	112	1,33±0,33	1,0±0,0	1,67±0,33	2,0±0,33	2,33±0,67	2,67±0,33	1,33±0,33	1,0±0,0
TIMP 2	28	1,0±0,0	1,33±0,33	1,67±0,33	1,33±0,33	1,67±0,33	2,00±0,00	2,0±0,0	1,33±0,3
	112	2,33±0,0	2,0±0,0	2,33±0,33	2,0±0,58	2,67±0,33	2,0±0,58	0,67±0,33	1,33±0,3
MMP 2	28	3,0±0,0	3,0±0,0	2,0±0,0	3,0±0,0	2,33±0,33	2,67±0,33	2,5±0,5	1,0±0,0
	112	2,33±0,33	2,0±0,0	2,33±0,33	1,33±0,33	2,67±0,33	3,0±0,00	2,33±0,67	2,33±0,33
MMP 9	28	3,0±0,0	2,33±0,33	2,0±0,58	3,0±0,0	2,67±0,33	3,0±0,00	3,0±0,0	1,67±0,33
	112	1,67±0,7	1,0±0,0	1,33±0,33	1,67±0,67	1,67±0,33	1,67±0,33	2,33±0,33	2,33±0,33

Примечание: маркеры ИГХ оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия

Таким образом, анализ иммуногистохимического исследования показал, что применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения, приводит к улучшению васкуляризации увеличение экспрессии VEGF в сравнении с другими группами; применение концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека при МЛП у лабораторных животных с 14

суток до 112 суток после облучения приводит к ускоренному рубцеванию и заживлению язвенной поверхности – увеличение экспрессии металлопротеиназ (ММР 2 и 9), TIMP 2, коллагена I и III типа, $p < 0,05$. Применение МСК слизистой десны крысы, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны крысы, МСК плаценты человека и отсутствие терапии в группе контроль при местных лучевых поражениях с 21 суток до 112 дня после облучения приводит к увеличению воспалительного процесса - увеличение маркера клеток макрофагального ряда CD68 в тканях с $12,9 \pm 1,9$ до $29,3 \pm 4,3$; с $11,7 \pm 1,4$ до $24,7 \pm 2,4$; с $11,4 \pm 1,5$ до $25,7 \pm 3,9$; с $16,6 \pm 2,3$ до $31,1 \pm 3,9$; соответственно, $p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованные методы лечения (МСК, концентраты культуральной и кондиционированных сред в дозе 2 млн на 1 кг) эффективны при МЛП кожи и приводили к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов (ускорение перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации). Кроме того, применение МСК слизистой десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем аналогичные клетки, полученные от лабораторных животных (крысы). Полученные результаты имеют важное теоретическое значение в понимании механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях и позволяют рекомендовать применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для лечения местных лучевых поражений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека эффективно и приводит к сокращению язвенной поверхности местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения на 87%, 85,7% и 95,4% соответственно.
2. Иммуногистохимические исследования показали, что применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения приводит к улучшению васкуляризации (увеличение экспрессии VEGF) и увеличению числа нервных волокон (увеличение PGP 9.5).
3. Показано, что применение МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы не приводит к существенному сокращению местных лучевых поражений и способствует увеличению макрофагальной инфильтрации у лабораторных животных (увеличение маркера CD 68) с 14 суток по 112 сутки.
4. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека, а также концентрата культуральной среды показало наибольшую эффективность - полное заживление язвенной поверхности на 112 сутки в 60% и 40 % случаев, соответственно. Применение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, МСК плаценты человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой крысы приводит к полному заживлению в 20% случаев; применение МСК слизистой

десны крысы и отсутствие терапии в группе контроль не приводит к полному заживлению.

5. Показано, что применение МСК из различных источников (слизистая ткань десны человека, слизистая ткань десны крысы, плацента человека) при местных лучевых поражениях с 21 по 112 сутки после облучения приводит к усилению процессов неоангиогенеза (увеличение экспрессии CD31). Также применение МСК слизистой десны человека и МСК слизистой десны крысы приводит к усилению процессов ангиогенеза (увеличение VEGF в эндотелии и строме).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Nikitina VA, Astrelina TA, Ostashkin AS, Nugis VYu, Karaseva TV, Machova AE, Dobrovolskaya EI, Usupzhanova DYU, Rodin S, *Brunchukov VA*, Lauk-Dubitsky SE, Brumberg VA, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Lomonosova EE, Bushmanov AY, Samoilov AS. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture Clonal chromosome aberrations & aneuploidy in hMSC. PLoS One. 2018 Feb 12;13(2):e0192445. doi: 10.1371/journal.pone.0192445. eCollection 2018. (Цитирование в РИНЦ, Web of Science, вклад автора – 40%)
2. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Аксененко А.В., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., *Брунчуков В.А.*, Расторгуева А.А., Карасева Т.В., Удалов Ю.Д. Перспективы применения регенеративной медицины в клинической практике. Главврач. 2019. № 10. С. 38-47. DOI: 10.33920/med-03-1910-06 (Цитирование в РИНЦ, вклад автора – 20%)
3. *Брунчуков В.А.*, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, А.А. Расторгуева, Карасева Т.В., А.В. Гордеев, О.А. Максимова, Л.А. Наумова, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.Е. Махова, Е.Е. Ломоносова, Е.И. Добровольская, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов. Экспериментальное лечение местных лучевых поражений мезенхимальными стволовыми клетками и их кондиционной средой. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. Том 65. № 1, с.5-12. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12 (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора – 90%)
4. T. Astrelina, V. *Brunchukov*, A. Rastorgueva, D. Usupjanova, V. Nikitina, I. Kobzeva, A.Samoilov. Effectiveness of local MSC derived from placenta and their conditioned medium in local radiation burn. Cytotherapy. – May 2020. Vol. 22, Issue 5, Supplement, P. S66 (98) <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.03.101> (Цитирование в Web of Science, вклад автора – 85%)
5. *Vitaliy Brunchukov*, Tatiana Astrelina, Daria Usupzhanova, Anna Rastorgueva, Irina Kobzeva, Victoria Nikitina, Sergei Lishchuk, Elena Dubova, Konstantin Pavlov, Valentin Brumberg, Marc Benderitter, Alexander Samoylov. Evaluation of the effectiveness of mesenchymal stem cells of the placenta and their conditioned medium in local radiation injuries. Cells 2020, 9(12), 2558; DOI: 10.3390/cells9122558 (Цитирование в РИНЦ, Web of Science, вклад автора – 90%)
6. T.Astrelina, V.*Brunchukov*, A.Rastorgueva, D.Usupzhanova, V.Nikitina, I.Kobzeva, L.Sergey, A.Samoilov. Comparison of the therapeutic potential of human and rats mesenchymal stem cells and their conditioned medium with local radiation injuries. Cytotherapy. Volume 23, Issue 5, Supplement, May 2021, P.S44, <https://doi.org/10.1016/S1465324921003157>.

(Цитирование в Web of Science, вклад автора – 85%)

7. В.А. Никитина, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.Ю. Нугис, Е.Е. Ломоносова, В.В. Семина, В.А. Брунчуков, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брумберг, А.А. Расторгуева, Т.В. Карасева, А.С. Самойлов. Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток. *Цитология*, 2021, том 63, № 3, с. 207–220. DOI: 10.31857/S0041377121030081. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора – 40%)
8. В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, А.С. Самойлов. Анализ эффективности применения клеточной терапии при местных лучевых поражениях. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2021. Том 66. №1, с.69-79. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-1-69-78. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора – 90%)
9. Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Кобзева И.В., Никитина В.А., Лищук С.В., Дубова Е.А., Павлов К.А., Брумберг В.А., Самойлов А.С. Сравнение терапевтического потенциала мезенхимальных стромальных клеток крыс и человека и их кондиционированных сред при местных лучевых поражениях // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2021. Т. 66. № 4. С.5–12. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-5-12. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора –80%)
10. Астрелина Т.А., Аксененко А.В., Кобзева И.В., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., А.С. Самойлов. Применение регенеративных клеточных технологий при лечении тяжёлых местных лучевых поражений у пострадавших в чрезвычайных ситуациях: из опыта работы специалистов Федерального медицинского биофизического центра им. А.И.Бурназяна ФМБА России. *Медицина катастроф*, №3•2021, С. 58-64, <https://doi.org/10.33266/2070-1004-2021-3>. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора –30%)
11. V.A. Nikitina, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.Yu. Nugis, E.E. Lomonosova, V.V.Semina, V.A. Brunchukov, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brumberg, A.A. Rastorgueva, T.V. Karaseva, and A.S. Samoilov. Cytogenetic Characteristics of Diploid Lines of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. *Cell and Tissue Biology*, 2021, Vol. 15, No. 6, pp. 604–615. DOI: 10.1134/S1990519X21060146. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, Scopus, вклад автора –30%)
12. Варьясова А.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Карасёва Т.В., Брумберг В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Леваков С.А., Самойлов А.С. Выделение и биологические характеристики стволовых клеток плаценты. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2021; 20(5): 20–28. DOI: 10.20953/1726-1678-2021-5-20-28. (Цитирование в РИНЦ, ВАК, вклад автора –30%)

Патент

1. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Аксененко А.В., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Удалов Ю.Д. Способ повышения эффективности комплексной терапии при местных лучевых поражениях. Патент. - № 2744519, зарегистрирован 11.03.2021.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ИИ – ионизирующее излучение
- Гр – Грей
- МЛП- местные лучевые поражения
- МСК – мезенхимальные стромальные клетки
- CD – кластер дифференцировки